

Chloromonas (Chlorophyceae) の微細構造： 免疫電子顕微鏡法によるピレノイドの観察

長 船 哲 齊* ***・江 原 友 子**・長 谷 榮 二***・小 早 川 ゆ り****
浜 田 元 輔****・清 原 伸 彦****・大 和 眞***

(平成 9 年 10 月 13 日受付, 平成 9 年 11 月 12 日受理)

Studies of Pyrenoid Structures in *Chloromonas* (Chlorophyceae) by Immunoelectron Microscopy

Tetsuaki OSAFUNE, Tomoko EHARA, Eiji HASE, Yuri KOBAYAKAWA,
Motosuke HAMADA, Nobuhiko KIYOHARA and Makoto YAMATO

Chloromonas is a unicellular, biflagellate member of the green algal order *Chlamydomonas*. Ettl (1967)³⁾ and Iyengar *et al.* (1980)⁶⁾ reported that *Chloromonas* differs little from its sister genus, *Chlamydomonas*; *Chloromonas*, however, is diagnosed by the absence of pyrenoids in the chloroplast. Recently, the absence of pyrenoids in the chloroplast of *Chloromonas* is universally accepted.²⁻⁷⁾ In this study, structures of pyrenoid and distribution of RuBisCO in *Chloromonas insignis* were examined by immunoelectron microscopy. We found that RuBisCO is localized over pyrenoid-like structures in the chloroplast of *C. insignis*. It is suggested that the pyrenoids are present in a chloroplast of *C. insignis*.

Key words: *Chloromonas*, Pyrenoid, Immunoelectron microscopy

キーワード: クロロモナス, ピレノイド, 免疫電子顕微鏡法

序 論

現在, 単細胞藻クロロモナス (*Chloromonas*) は狭義の緑藻クラミドモナス目 *Chlamydomonadales* に分類されている¹⁾。クロロモナス細胞には 2 本の等長鞭毛があり遊泳するが, 細胞分裂に先立って鞭毛は脱落することが知られており, さらに葉緑体内には眼点をもちクラミドモナス細胞とは多くの点で類似した構造をもっている²⁾。従来から, クロロモナスとクラミドモナス (*Chlamydomonas*) の大きな相違点は前者にピレノイド構造が存在しないというのが特徴と考えられ, ピレノイドはクラミドモナスを分類する重要な指標の一部ともみなされてきた²⁻⁷⁾。一方, クラミドモナスのピレノイドは葉緑体の中央部にあって, その基質中をチラコイド膜 (thylakoid) が貫通し周囲はデンプン顆粒で取り巻かれている⁸⁾。ピレノイドの構造的な特徴の一つは周囲のストロマと区別する境界膜が存在しない^{8,17)}。そして, ピレノイ

ドを電子顕微鏡で観察すると, ピレノイドはストロマ部分に比較し電子密度が高く球体で, その構造は容易に判別することができる^{8,17)}。

本研究は, ピレノイドが存在しないといわれているクロロモナス属²⁻⁷⁾ のうち *Chloromonas insignis* 株について, プロテイン A-コロイド金粒子を用いた連続超薄切片-免疫電子顕微鏡法により, リブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (RuBisCO) 酵素の 3 次元分布を調査した。その結果, クロロモナス属の *C. insignis* 株にはピレノイドが存在することがわかったので報告する。

方 法

使用藻株:

Chloromonas insignis (クロロモナス) は国立環境研究所微生物系統保存施設から分与されたものである。ク

* 自然科学研究室 (生命科学専攻), ** 東京医科大学 (微生物研究室), *** 体育研究所, **** 運動方法 (水泳研究室)

クロモナス細胞は独立栄養条件下で培養したのち、樹脂包埋し連続超薄切片-免疫電子顕微鏡法による観察を行った。

電子顕微鏡の固定、包埋:

クロモナス (*Chloromonas insignis* 株) 細胞の電子顕微鏡固定は細胞培養液中に、直接グルタルアルデヒド (50% 水溶液: EM Lab., USA) を最終濃度が 1% (v/v) になるように添加し、4℃, 60 分間処理した。免疫電子顕微鏡法による細胞の観察はグルタルアルデヒド溶液のみで固定処理を行った。一方、細胞の超微細構造の観察には 1% オスミック酸水溶液 (v/v) で 4℃, 60 分間の二重固定したのち、次に試料を 2% アガロース (ナカライテクス KK) に包埋したのち、約 1 mm³ の寒天ブロックを作製した。寒天ブロックは 50~90% エタノール系および 90~100% アセトン系列で脱水し、Epoxy 812 樹脂または Spurr 樹脂に包埋した。試料の超薄切片は超ミクロトーム (Dupont MT-1 型) で作成した。免疫電子顕微鏡法による観察には抗 RuBisCO の抗体⁹⁾を用いて、細胞内の RuBisCO 酵素の局在性を追究した。抗 RuBisCO 抗体は中野長久教授 (大阪府立大学) から分与されたものである。その作成は RuBisCO 酵素を抽出、精製し抗原とし抗原をウサギに注射し抗 RuBisCO 抗体を得た。免疫電子顕微鏡法の試料は超ミクロトームで通常より厚く (100 nm 前後) 連続的に超薄切し、ホルムバルまたはコロジオン支持膜を張ったニッケル製の特殊グリッド (日新 EM 社) に積載した¹⁰⁾。最初に、目的とする抗原 (RuBisCO) を超薄切片の表面に露出させるため、超薄切片を 0.3% 過酸化水素水で 3~10 分間処理し、次に 0.01 M リン酸緩衝食水で 30 分間に 4 回洗浄した。洗浄操作はパラフィルムの上に PBS を水滴状に並べ、グリッドを順次に各々の PBS 中へ移動させた。超薄切片を BSA-PBS (PBS に 1% ウシ血清アルブミンを溶解: 半井化学薬品) の中に 30 分間浸せきしブロッキング処理を行った。抗 RuBisCO 抗体は PBS で 400 倍に希釈し超薄切片上で 37℃, 20 分間反応させた。次に、超薄切片は 0.05% Tween-20 を含む PBS で洗浄した。2 次抗体プロテイン A-コロイド金粒子 (EY Lab., Inc., USA) は PBS で 20 倍に希釈し、超薄切片の上で 20 分間、室温で反応させた。次に、0.05% Tween-20 を含む PBS で超薄切片を 15 分間洗浄した。電子染色の前には自動洗浄装置を用いて蒸留水で超薄切片を約 15 分間洗浄し、PBS を完全に除去した後、3% ウラニル酢酸で 20~30 分間の染色処理を行った¹¹⁾。免疫染色した試料は日本体育大学健志台キャンパス電子顕微鏡室の大型電子顕微鏡 JEOL-100CX 型 (日本電子 KK) を用い

て、加速電圧 80 kV で観察し撮影した。

結 果

図 1 は連続超薄切片法-透過型電子顕微鏡により観察されたクロモナスの超薄切片像の一部である。細胞の中央部には細胞核があり、その周囲には葉緑体 (C) が見られる。矢印は葉緑体のストロマに存在する電子密度の高い構造を示している (図 1: 矢印)。その構造内部にはチラコイド膜が観察される (図 1)。電子密度の高いピレノイド様構造は連続超薄切片法-電子顕微鏡観察から葉緑体の先端部位に特異的に配置されることがわかった。図 2 は電子密度の高いピレノイド様構造を拡大したものである。矢印は連続超薄切片法により見いだされたピレノイド様構造を示す (図 2: 矢印)。その構造の周辺部にはデンプン粒 (S) が観察される (図 2)。図 3 はピレノイド様構造の免疫電子顕微鏡像である。コロイド金粒子 (リブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ酵素の配置を示す) が電子密度の高いピレノイド様構造上に、特異的に局在することが明らかになった。

考 察

図 1 に示したようにクロモナスの細胞核の周囲には、葉緑体がみられる。葉緑体内部には連続超薄切片法-電子顕微鏡観察により、新しく見いだされたピレノイド様構造が観察される (図 1 の矢印に示す)。葉緑体内部のピレノイド構造 (矢印) は不定形で電子密度が高く、その中を数本のチラコイド膜が平行に貫通しているのがわかる (図 1, 2)。クロモナスのピレノイド様構造を拡大するとデンプン粒 (S) がピレノイド周辺部に観察される (図 2)、この形態は一般に緑藻類のピレノイドにみられる代表的な特徴の一つである^{2,8)}。図 1, 2 に観察されるピレノイド様構造 (矢印) はクラミドモナス属のピレノイドと良く類似しているが、クラミドモナスのピレノイド構造の特徴は葉緑体内に個数が 1 個で、サイズが大きく球体で直径 1~3 μm 前後である。従来から、ピレノイドは藻類や一部の苔植物の葉緑体中において光合成炭酸固定酵素リブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼの貯蔵場所ではないか、と考えられてきた^{12~14)}。これは抗 RuBisCO 抗体-免疫電子顕微鏡法による観察でも、RuBisCO 酵素の大部分がピレノイドに特異的に局在性を示すことから推察できる^{12,15)}。

1989 年、Osafune らは同調培養した *Euglena gracilis* Z (ユーグレナ) の連続超薄切片法-免疫電子顕微鏡法およびコンピュータ・グラフィックスにより、RuBisCO 全量の約 80% がピレノイドに、約 20% がスト



図1 クロロモナス (*Chloromonas insignis*) の連続超薄切片法-透過型電子顕微鏡像の一部を示す

クロロモナスは国立環境研究所微生物系統保存施設から分与された。細胞はグルタルアルデヒド前固定、四酸化オスミウム後固定し連続的に超薄切したのち、透過型電子顕微鏡 80 kV で観察した。矢印は葉緑体内にみられる不定形で電子密度の高いピレノイド構造を示す。

C: 葉緑体, E: 眼点, M: ミトコンドリア, N: 細胞核, G: ゴルジ装置

ロマに分布することを最初に見いだした^{12,15)}。同時にユーグレナ細胞のピレノイド構造は、安定な一定の形態に留まっているのではなく、細胞周期の進行に伴ってダイナミックな挙動を示すことを明らかにした¹²⁾。同じように *Chlamydomonas reinhardtii* (クラミドモナス) や *Chlorella pyrenoidosa* 細胞においても大部分の RuBisCO はピレノイドに濃縮して観察されることが免疫電子顕微鏡法を用いて報告されている^{17,18)}。図3はクロロモナスの細胞を抗 RuBisCO 抗体処理したのち免疫電子顕微鏡法によって観察したものである。すなわち、RuBisCO 酵素の存在を示すコロイド金粒子が電子密度の高い構造 (図1, 2) の上に局在していることがわかる。このように従来の単細胞藻類のピレノイド構造^{12~18)}にみられる特徴と、今回のクロロモナスのピレノイド様構造との知見は良く一致している。したがって、*C. insignis* 株にみられる葉緑体内部の電子密度の高い構造

はピレノイドと同定された。今後さらに、*C. insignis* 株の細胞周期におけるピレノイドの動態等を調査していきたい。

以上の結果からピレノイド構造の有無に関する判断については、先端技法の免疫電子顕微鏡法-コンピュータ・グラフィックスによる RuBisCO 酵素の3次元分布の解析等を行い、より詳細な観察をする必要があると思われる。本報告は国立環境研究所から分与された *C. insignis* 1株についての知見であるが、今後さらに他のクロロモナス株について、ピレノイド構造の有無の調査や細胞周期についても観察する予定である。

要 約

Chloromonas は狭義の緑藻クラミドモナス目 Chlamydomonadales に分類されている。クロロモナスとクラミドモナス (*Chlamydomonas*) の大きな相違点は前者に



図2 クロロモナス (*Chloromonas insignis*) の連続超薄切片法-電子顕微鏡拡大像

葉緑体内の電子密度の高い構造 (ピレノイド: 矢印に示す) を拡大したものである。数本のチラコイド膜がピレノイド構造内部を平行に貫通している。また、代表的なピレノイド構造の特徴であるデンプン粒 (S) がピレノイド構造の周辺部を取り囲んでいる。

S: デンプン粒

図3 抗 RuBisCO 抗体-免疫電子顕微鏡像

クロロモナス (*Chloromonas insignis*) の超薄切片を抗 RuBisCO 抗体-protein A コロイド金粒子で処理した免疫電子顕微鏡像である。葉緑体内の電子密度の高い構造に、RuBisCO 酵素の細胞内配置を示す金粒子が特異的に局在しているのがわかる。

ピレノイド構造が存在しないというのが特徴と考えられ、ピレノイドはクラミドモナスを分類する重要な指標の一部ともみなされてきた。一方、クラミドモナスのピレノイドは葉緑体の中央部において、その基質中をチラコイド膜が貫通し周囲はデンプン顆粒で取り巻かれている。ピレノイドの構造的な特徴の一つは周囲のストロマと区別する境界膜が存在しないことである。そして、ピレノイドを電子顕微鏡で観察すると、ピレノイドはストロマ部分に比較し電子密度が高く球体で、その構造は容易に判別することができる。

本研究は、ピレノイドが存在しないといわれているク

ロロモナス属のうち国立環境研究所の保存株 *Chloromonas insignis* について、プロテインA-コロイド金粒子を用いた連続超薄切片-免疫電子顕微鏡法により、リブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ酵素の3次元分布を調査した。その結果、クロロモナス属の *C. insignis* 株にはピレノイドが存在することが明らかになった。ピレノイド構造の有無に関する判断については、先端技法の免疫電子顕微鏡法-コンピュータ・グラフィックスによる RuBisCO 酵素の3次元分布の解析などを行い、今後より詳細な観察をする必要があると思われる。

謝 辞

研究の一部は平成9年度・文部省科学研究費・基盤研究(C)第09640795号, 平成7年度・文部省科学研究費・総合研究(A)第07304082号, 基盤研究(C)第07640886号, 日本体育大学特別研究費および日本私学振興財団・学術研究振興資金の補助によって行われた。

文 献

- 1) Mattox, K. R. and Stewart, K. D.: Classification of the green algae: A concept based on comparative cytology. In Irvine, D.E.G. & John, D. M. (Eds.) *Systematics of the Green Algae*, Academic Press, London, pp. 29-72 (1984).
- 2) 大谷修司, 秋山 優: 藻類の生活史集成第一巻, 堀 輝三編, pp. 8-9 (1993).
- 3) Ettl, H.: Die Feinstruktur von *Chlamydomonas rosea* Ettl, *Protoplasma*, **64**, 134-146 (1967).
- 4) Ettl, H.: Die Gattung *Chlamydomonas* Gobi emend. Wille. *Nova Hedwigia*, **34**, 1-283 (1970).
- 5) Ettl, H.: Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 9: Chlorophyta I. Phytomonadina. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena (1983).
- 6) Iyengar, M.O.P. and Desikachary, T. V.: *Volvocae*, Ed. Indian Council of Agriculture Res. New Delhi (1981).
- 7) Buchheim, M. K., Buchheim, J. A. and Chapman, R. L.: Phylogeny of *Chloromonas* (Chlorophyceae): A study of 18s ribosomal RNA gene sequences, *J. Phycology*, **33**, 286-293 (1997).
- 8) Manton, I.: Observations of on plastid development in the meristem of *Anthoceros*, *J. Exp. Bot.*, **13**, 325-333 (1962).
- 9) Ehara, T., Sumida, S., Osafune, T. and Hase, E.: Three-dimensional distribution of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase during the early development of proplastids in dark-grown *Euglena* cells transferred to an inorganic medium. *Electron Microsc.*, Eds. L. D. Peachey, D. B. Williams, Vol. 3: Biological Sciences, San Francisco Press Inc. USA., pp. 906-907 (1990).
- 10) Osafune, T.: Three-dimensional structures of giant mitochondria, dictyosomes and "centric lamellar bodies" formed during the cell cycle of *Euglena gracilis* Z in synchronous culture, *Electron Microscopy*, **22**, 51-61 (1973).
- 11) Osafune, T., Schiff, J. A. and Hase, E.: Stage-dependent localization of LHCP II apoprotein in the Golgi of synchronized cells of *Euglena gracilis* by immunogold electron microscopy, *Experimental Cell Research*, **193**, 320-330 (1991).
- 12) Osafune, T., Yokota, A., Sumida, S. and Hase, E.: Immunogold localization of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase with reference to pyrenoid morphology in chloroplasts of synchronized *Euglena gracilis* cells, *Plant Physiol.*, **92**, 802-808 (1990).
- 13) Okada, M., Okabe, M., Kono, M. and Nakayama, K.: Peptide composition and enzyme activities of isolated pyrenoids from the green alga *Bryopsis maxima*, *Can. J. Bot.*, **69**, 1053-1061 (1991).
- 14) Holdsworth, R. H.: The isolation and partial characterization of the pyrenoid protein of *Eremosphaera viridis*, *J. Cell Biol.*, **51**, 499-513 (1971).
- 15) Osafune, T., Sumida, S., Ehara, T. and Hase, E.: Three-dimensional distribution of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in chloroplasts of actively photosynthesizing cell of *Euglena gracilis*, *J. Electron Microscopy*, **38**, 399-404 (1989).
- 16) Salisbury, J. L. and Floyd, G. L.: Molecular, enzymatic and ultrastructure characterization of the pyrenoid of the scaly green monad *Micromonas squamata*, *J. Phycology*, **14**, 362-368 (1978).
- 17) 長船哲齊, 津山 薫, 古田裕子, 長谷榮二, 江原友子: 同調培養クラミドモナスのピレノイド構造と RuBisCO の動態, 日本電子顕微鏡学会第53回学術講演要旨集, p. 156 (1997).
- 18) MaCurry, S. D. and Gibbs, S. P.: Immunocytochemical localization of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in light-limited and light-saturated cells of *Chlorella pyrenoidosa*, *Protoplasma*, **149**, 31-37 (1989).